DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.02.017

家兔绿脓杆菌败血症时血浆 TNF 的改变*

刘 韧 汪江淮 陈惠孙 王正国 王 涛 蒋建新 刁有芳 田昆仑
(第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 给正常家兔静脉注射不同剂量绿脓杆菌活菌(7×10^9、2×10^{10}/kg)造成败血症后,外周血中 TNF 水平明显升高,其变化特征与内毒素休克并不相同,2×10^{10}/kg 组血浆 TNF 水平显著高于 7×10^9/kg 组($P<0.01$)。输注绿脓杆菌活菌后,与对照组相比,血浆胰高血糖素呈持续升高($P<0.05\sim0.01$),胰岛素和血糖有短暂升高($P<0.05\sim0.01$),血浆乳酸和 β-G 水平呈持续增高($P<0.05\sim0.01$),上述改变在 2×10^{10}/kg 组要甚于 7×10^9/kg 组($P<0.05\sim0.01$),此外 2×10^{10}/kg 组动物死亡率和 MABP 的下降较之 7×10^9/kg 组也更为严重。这些结果表明输注绿脓杆菌活菌后血浆 TNF 水平的升高与败血症的发生发展以及病变严重程度有密切关系。

关键词 败血症;绿脓杆菌;肿瘤坏死因子

肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)是由单核/巨噬细胞在诱发剂(如内毒素)诱导下产生的一种蛋白质。最近的研究已经表明 TNF 在内毒素休克的发生发展过程中起着重要的介导作用[1,2],然而有关绿脓杆菌败血症时循环血中 TNF 的变化特点,以及血浆 TNF 水平与败血症时病变严重程度、糖代谢及相关激素改变的关系尚未见文献报道。

本实验给正常家兔静脉输注不同数量的绿脓杆菌活菌造成败血症模型,观察动物死亡率,平均动脉血压(Mean arterial blood pressure, MABP)、血浆 TNF、胰高血糖素、胰岛素、血糖、乳酸、β-葡萄糖醛酸酶(β-glucuronidase, β-G)的改变,目的是探讨不同程度绿脓杆菌败血症时外周血中 TNF 的变化规律及其对休克严重程度的影响。

1 材料和方法

健康家兔 40 只,性别不拘,称重 2.65±0.30kg,随机分为生理盐水对照组($n=12$);7×10^9 绿脓杆菌败血症组($n=14$);2×10^{10}绿脓杆菌败血症组($n=14$)。实验前动物禁食过夜,自由饮水。实验当天 3%戊巴比妥钠(30mg/kg)经耳缘静脉麻醉后,动物固定于兔台上,常规气管切开插管,自主呼吸。暴露右颈总动脉、左股动脉、左股静脉切开插管,备取血样、接血压计监测 MABP 和供输注绿脓杆菌活菌或回输液体用。动物全身肝素化(800u/kg),在记录 MABP、心率、呼吸或其他有关指标后,经左股静脉分别一次输注绿脓杆菌活菌 7×10^9、2×10^{10}/kg,绿脓杆菌活菌浓度分别配为 7×10^9、2×10^{10}/ml。于绿脓杆菌输注前后各个预定时相从右颈总动脉取血测定各有关指标,同时经左股静脉回输等容量的生理盐水。对照组动物除以等量生理盐水代替绿脓杆菌外,其他操作同实验组。

血浆 TNF 活性的测定按放线菌素 D 处理的 L929 靶细胞法[3]略加改进,放线菌素 D 系 SIGMA 产品,重组鼠 TNF 标准购自 GENZYME,结果表示为 ng/ml(1mgTNF=4×10^7u)。血浆胰高血糖素和胰岛素的测定采用放免法,胰高血糖素放免测定试剂盒购自美国 DPC 公司,胰岛素放免测定试剂盒购自成都同位素应用技术研究所,操作按说明书进行,结果分别以 pg/ml 和 μu/ml 表示。血糖、乳酸、β-G 的测定采用比色法,葡萄糖氧化酶测定试剂盒购自保定长城临床试剂公司,乳酸脱氢酶系 SIGMA 产品,结果分别以 mg/dl、mmol/L 和 Fishman U 表

* 国家自然科学基金资助项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

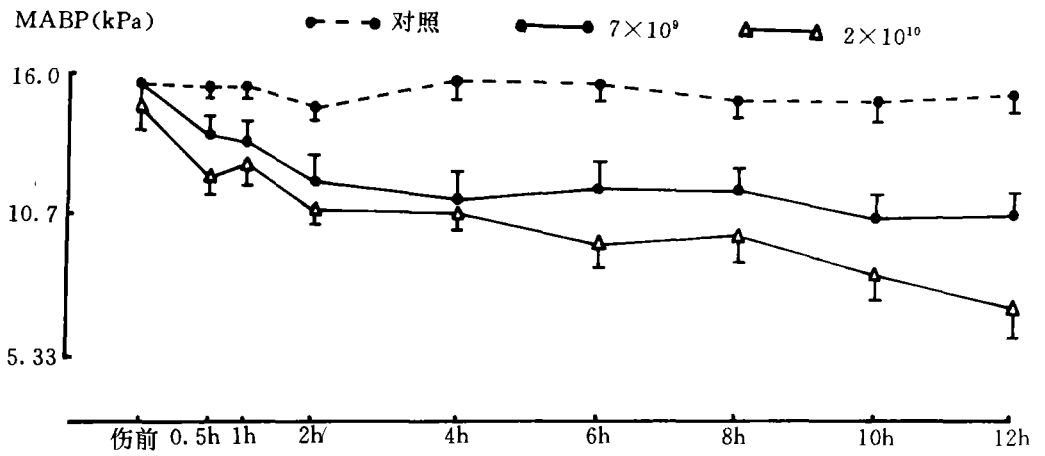
示。

差异的显著性按 t 检验、方差分析和 χ^2 检验行统计学处理，$P<0.05$ 示差异显著，$P<0.01$ 示差异非常显著，所有计量资料结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。

2 结果

2.1 MABP 和存活率

输注绿脓杆菌活菌后，MABP 呈持续下降，2×10^{10}/kg 组较 7×10^{9}/kg 组下降更为明显（$P<0.05\sim0.01$）（附图）。输注绿脓杆菌后 12，18 和 24h，两组动物存活率分别为 100%和 71%（$P>0.05$）、93%和 50%（$P<0.05$）、71%和 7%（$P<0.01$）（表 1）。



附图 不同剂量绿脓杆菌败血症时 MABP 的改变

Fig Changes of MABP after infusing different doses pseudomonas aeruginosa

······:control; ——·: 7×10^{9}; △——△: 2×10^{10}; A, before infusion.

表 1 不同剂量绿脓杆菌败血症时动物存活率

Tab 1 Effect of different dose pseudomonas aeruginosa on survival rate of rabbits

Group	Survival rate (%)		
	12 h	18 h	24 h
Control	12/12 (100)	12/12 (100)	12/12 (100)
7×10^{9}	14/14 (100)	13/14 (92.9)	10/14 (71.4)
2×10^{10}	10/14 (71.4)	7/14 (50.0)*	1/14 (7.14)**

vs 7×10^{9}, *$P<0.05$, **$P<0.01$

2.2 血浆 TNF

7×10^{9}/kg 组输注绿脓杆菌后 1 h 外周血中可测到 TNF 活性，2×10^{10}/kg 组则在 0.5 h。两组 TNF 峰值均在 4 h 处，至 8 h 处消失，2×10^{10}/kg 组血浆 TNF 水平要显著高于 7×10^{9}/kg 组（$P<0.01$）（表 2）。

表 2 不同剂量绿脓杆菌败血症时血浆 TNF 的改变(ng/ml)

Tab 2 Levels of plasma TNF after infusion different doses pseudomonas aeruginosa (ng/ml)

group	before infusion	after infusion							
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
control	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7×10^{9}	—	—	4.17±1.03	9.54±3.14	14.5±3.11	6.83±2.59	—	—	—
2×10^{10}	—	1.62±0.34	8.32±2.13**	17.6±4.16**	30.2±5.41**	9.19±3.07	—	—	—

vs 7×10^{9} **$P<0.01$; "—" undetected

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 血浆胰高血糖素和胰岛素

输注绿脓杆菌后，血浆胰高血糖素明显升高（$P<0.05\sim0.01$），胰岛素有一过性升高（$P<0.05\sim0.01$）（表 3），2×10^{10}/kg 组的上述改变甚于 7×10^{9}/kg 组（$P<0.05\sim0.01$）。

2.4 血浆葡萄糖、乳酸和 β-G

输注绿脓杆菌后，血糖有一短暂升高（$P<0.05\sim0.01$），而乳酸和 β-G 水平呈持续升高（$P<0.05\sim0.01$）（表 4,5），2×10^{10}/kg 组血糖，乳酸和 β-G 的改变甚于 7×10^{9}/kg 组（$P<0.05\sim0.01$）。

表 3 不同剂量绿脓杆菌败血症时血浆胰高血糖素和胰岛素的改变

Tab 3 Changes of plasma glucagon and insulin during pseudomonas aeruginosa septicemia

parameters	group	before infusion	after infusion				
			0.5 h	2 h	4 h	8 h	12 h
Glucagon (pg/ml)	Control	88.2±9.54	96.1±10.9	94.7±11.5	90.5±10.1	105±12.6	110±15.8
	7×10^{9}	86.4±10.1	110 ±12.8	134 ±19.8**	165 ±25.7**	177±30.1**	169± 3.14**
	2×10^{10}	98.7±11.4	119 ±17.6*	189 ±30.4**△△	217 ±38.5**△	254±41.6**△△	260±43.1**△△
Insulin (μu/ml)	Control	8.76±1.76	8.90±1.68	7.96±1.52	9.25±1.99	8.10±1.77	7.45±2.01
	7×10^{9}	8.90±1.59	8.45±1.70	12.8±2.15**	10.5±1.55	8.07±1.65	8.10±1.41
	2×10^{10}	8.00±1.47	9.01±1.67	12.5±3.01**	13.7±3.11*△	8.22±1.54	8.31±1.98

vs control $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; *vs* 7×10^{9} $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$

表 4 不同剂量绿脓杆菌败血症时血浆葡萄糖和乳酸的改变

Tab 4 Levels of plasma glucose and lactate acid during pseudomonas aeruginosa septicemia

parameters	group	before infusion	after infusion					
			0.5 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
Glucose (mmol/L)	control	2.19±0.33	2.24±0.35	2.33±0.29	2.45±0.35	2.42±0.41	2.50±0.42	2.61±0.39
	7×10^{9}	2.31±0.35	2.44±0.36	2.61±0.40	3.01±0.42*	3.88±0.46**	4.76±0.75**	4.88±0.85**
	2×10^{10}	2.27±0.30	2.81±0.41*	4.91±0.77**△△	7.35±1.54**△△	8.44±1.81**△△	9.26±1.91**△△	9.77±2.05**△△
Lactate acid (mg/dl)	Control	111±10.1	114±13.4	130±15.9	128±13.3	131±14.9	119±12.3	105±12.4
	7×10^{9}	120±12.3	119±14.1	151±17.8	180±19.4**	145±15.9	130±14.5	121±15.6
	2×10^{10}	107±11.9	130±15.9	191±21.7**△	256±41.7**△△	187±27.9**△	107±15.4△	117±13.4

vs control $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; *vs* 7×10^{9} $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$

表 5 不同剂量绿脓杆菌败血症时血浆 β-G 的改变(Fishman U)

Tab 5 Changes of plasma β-G during pseudomonas aeruginosa septicemia (Fishman U)

Group	Before infusion	After infusion					
		0.5 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
Control	747±128	801±130	779±134	792±134	812±129	810±141	807±145
7×10^{9}	801±132	810±137	954±166	1088±244*	1467±241**	1592±291**	1588±281**
2×10^{10}	774±135	991±176	1180±307*	1680±340**△△	2044±307**△△	2251±298**△△	2217±317**△△

vs control $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; *vs* 7×10^{9} $^{\triangle\triangle}P<0.01$

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

本实验结果表明，输注绿脓杆菌后 12，18，24 h，7×10^9/kg 和 2×10^{10}/kg 两组动物死亡率分别达到 0%和 28.6%；7.1%和 50%；28.6%和 92.9%。12 h 两组动物 MABP 分别为 10.7kPa 和 6.8kPa，血乳酸分别为 4.88 和 9.77mmol/L，血浆 β-G 分别为 1588 和 2217 Fishman U。就临床而言，近年来绿脓杆菌败血症正呈上升趋势，特别是在烧伤感染后。复制活菌脓毒败血症一般采用致病性埃希氏大肠杆菌，本实验采用给家兔输注绿脓杆菌活菌复制败血症，结果表明是一反映临床败血症/感染性休克病变过程较为成功的动物模型。

国外学者已经报告了输注 LPS 造成内毒素休克时循环血中 TNF 变化和动力学特征[4~6]，输注 LPS 后，血中 TNF 的出现时相约在 10～45min，1～2 h 达到峰值，3～6 h 消失。但是有关绿脓杆菌败血症时血浆 TNF 的变化规律尚未见文献报道。本文报告家兔绿脓杆菌败血症时血浆 TNF 的变化规律，输注绿脓杆菌活菌后，血浆 TNF 在 0.5～1 h 可测出，4 h 达到峰值，至 8 h 消失，循环血中 TNF 的动态变化呈一较为平坦的单峰曲线。

已经发现实验性内毒素休克时外周血中 TNF 的水平与动物低血压的发生，局灶性肝坏死，血管内纤维结合蛋白沉积以及死亡率密切相关[4,6]。本实验结果表明重度绿脓杆菌败血症（2×10^{10}/kg 组）时，循环血中 TNF 水平显著升高，休克动物 MABP 持续下降，血浆胰高血糖素呈持续升高水平，胰岛素和血糖水平有短暂升高，而血浆乳酸水平呈持续进行性升高，并且还存在着严重的溶酶体破坏，表明 TNF 能引起高代谢改变。同时血浆 TNF 水平的升高与 MABP 的下降具有密切关系，尽管输注绿脓杆菌 6 h 后，外周血 TNF 不再升高并下降，但 TNF 与机体各个靶器官或靶细胞受体的结合[7]以及通过诱导其他细胞因子如白介素-1（Interleukin-1，IL-1），白介素-6（Interleukin-6，IL-6），血小板激活因子（platelet activating factor，PAF）的释放[8]而导致 MABP 的继续下降。TNF 释放增多引起的高代谢改变，以及 TNF 对 MABP 下降的直接或间接作用所引起的全身组织灌流减少，均能引起组织无氧酵解的增强，导致高乳酸血症，而乳酸水平的高低则是反映休克严重程度和估价预后的一个重要参数[9]。这些动态测定指标的改变，以及休克动物病变严重程度与循环血中 TNF 的出现和水平的升高具有一致性。而在轻度绿脓杆菌败血症（7×10^9/kg 组）时，循环血中 TNF 水平明显低于 2×10^{10}/kg 组，结果 MABP 的下降有所恢复，血浆胰高血糖素和血糖的异常升高明显下降，乳酸血症和溶酶体的破坏明显减轻，休克动物活存率明显提高。

上述实验结果表明，输注绿脓杆菌活菌复制家兔败血症模型，其循环血中 TNF 水平升高的程度与败血症休克的发生发展以及病变损伤的严重程度具有密切关系，但是要想阐明 TNF 在败血症/感染性休克中的确切作用地位，尚需进行更为深入的研究。

（本所一室李磊博士馈赠绿脓杆菌活菌，特此致谢。）

参考文献

1. Ciancio MJ，Hunt J，Jones SB，et al. Comparative and interactive in vivo effects of tumor necrosis factor α and endotoxin. Circ Shock，1991；33：108
2. 汪江淮 王正国。TNF 在内毒素/感染性休克发病机理中的作用。第三军医大学学报，1992；14(2)：

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

101

3. Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cytotoxic assays for tumor necrosis factor. J Immunol Methods, 1984; 68: 167
4. Feuerstein G, Hallenback JM, Vanatta B, et al. Effect of gram-negative endotoxin on level of serum corticosterone, TNF-α, circulating blood cells, and the survival of rats. Circ Shock, 1990; 30: 265
5. Evans GF, Snyder YM, Butler LD, et al. Differential expression of interleukin-1 and tumor necrosis factor in murine septic shock models. Circ Shock, 1989; 29: 279
6. Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram-negative bacterial lipopolysaccharide induced injury in rabbits. J Clin Invest, 1988; 81: 1925
7. Smith RA, Kirstein M, Fiers W, et al. Species specificity of human and murine tumor necrosis factor. A comparative study of tumor necrosis factor receptors. J Biol Chem, 1986; 261: 14871
8. Tracey KJ, Lowry SF. The role of cytokine mediators in septic shock. Adv Surg, 1990; 23: 21
9. Vladimir V, Cowley RA. Blood lactate in the prognosis of various forms of shock. Ann Surg, 1971; 173: 308

(收稿 1992-05-25; 修回: 1992-11-25)

Changes of plasma TNF level during pseudomonas aeruginosa septicemia in rabbits

Liu Ren, Wang Jianghuai, Chen Huisun, et al (Research Institute of Field Surgery, Third MIlitary Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract It was found that after 2 dosages of Pseudomonas aeruginosa suspension (7×10^9/kg and 2×10^{10}/kg) were infused to rabbits respectively to induce septicemia, the elevation of the tumor necrosis factor (TNF) level in the circulating blood was higher in 2×10^{10}/kg group than in 7×10^9/kg group. The dynamic changes of circulation TNF in P. aeruginosa septicemia were different from those in endotoxin shock. There was a continous increase of plasma glucagon, lactic acid and β-G ($P<0.05\sim0.01$) and a transient increase of plasma insulin and glucose ($P<0.05\sim0.01$). These changes were more marked in the 2×10^{10}/kg group than in the 7×10^9/kg group ($P<0.05\sim0.01$). The death rate was higher and the decrease of MABP more severe in the 2×10^{10}/kg group than in the 7×10^9/kg group. These findings suggest that there may be a correlation between the elevation of TNF level in circulating blood and the severity of the pathological manifestations of P. aeruginosa septicemia.

Key words septicemia; Pseudomonas aeruginosa; tumor necrosis factor

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net